

<p>56352W/34 B02 D16 MICROBIOCH RES FOUN 01.08.73-JA-085884 (04.04.75) Isoflavone cpd. inhibiting catechol-O-methyl transferase - prepd. by culture of <i>Actinomyces roseolus</i> ISP-5174</p>	<p>ZAID 01.08.73 *J5 0035-393</p>	<p>B6-A1, B12-F5, B12-G1. yellow (I) m.pt. 176°, yellow (II) m.pt. 180° and brown (III) m.pt. 215° powders were obtd. at 58.0, 24.0, and 12.5 mg resp. from 4 l filtrate, (IV) was inhibited at 50% by 50, 78, and 5 γ of cpds. (I), (II) and (III), resp. The cpds. also inhibited histidine decarboxylase. The cpds. reduced the blood pressure.</p>	<p>Novel isoflavon cpds. (I), (II) and (III)</p> <div data-bbox="617 1617 812 2016"> </div> <p>(I) (X=H, Y=OMe, Z=OH) (II) (X=OMe, Y=H, Z=OH) (III) (X=OMe, Y=OMe, Z=H)</p> <p>inhibiting catechol-o-methyl transferase (IV) were produced by <i>Actinomyces roseolus</i> ISP 5174. In example the microbe was cultured on a medium (pH 7.4) contg. soybean cake 2, glucose 1, starch 2, NaCl 0.25, CaCO₃ 0.35, CuSO₄ 5H₂O 0.0005, MnCl₂ 4H₂O 0.0005 and ZnSO₄ 7H₂O 0.005% at 27° for 5 days. The cpds. were extd. with BuOAc from the culture filtrate, concd. pptd. with petroleum ether, dissolved in Me₂CO, and fractionated by a silica gel column chromatog. By concn. to dryness of each fraction, pale</p>
---	--	--	--

C



(2000円)

特 許 願

第 1 号

昭和49年8月1日

特許庁長官へ

1. 発明の名称 カタコールメタル転移酵素の阻害作用を有する新規インフラボン化合物の微生物による製造法

2. 発明者 住所 東京都練馬区豊玉北4の23

氏名 梅 沢 英 夫 外4名

3. 特許出願人 住所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

名称 財団法人微生物化学研究会

代表者 市 川 清 二

一國籍

4. 代理人 住所 〒105 東京都港区西新橋1丁目2番9号 三井物産館内 電話(591)0261番 2273

(2400) 氏名 金 丸 義 男 外4名

① 日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 50-35393

④公開日 昭50.(1975) 4. 4

②特願昭 48-85884

②出願日 昭48.(1973) 8. 1

審査請求 未請求 (全12頁)

庁内整理番号 7048 49

7110 49 6910 44

7048 49

⑤日本分類

36(2)D521

36(2)D914

36(2)C0

16 E41

⑥Int. Cl²

C12D 13/10

A61K 37/04

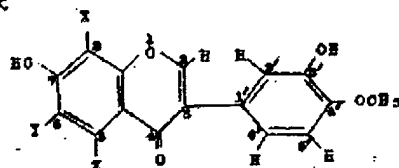
明 細 書

1. 発明の名称

カタコールメタル転移酵素の阻害作用を有する新規インフラボン化合物の微生物による製造法

2. 特許請求の範囲

放線菌に属する新規インフラボン化合物生産菌を好意的に培養してカタコールメタル転移酵素を阻害するインフラボン化合物を生産せしめ、これを培養物から採取することを特徴とする一般式



X = H, Y = OCH₃, Z = OH (化合物(I))

X = OCH₃, Y = H, Z = OH (化合物(II))

X = OCH₃, Y = OCH₃, Z = H (化合物(III))

を有するカタコールメタル転移酵素の阻害作用を有する新規インフラボン化合物(I), (II), (III)の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はカタコールメタル転移酵素(以下COMTと略記する)の強力な阻害剤である5,8,7-トリヒドロキシ-6,8-ジメトキシ-インフラボン(I), 5,8,7-トリヒドロキシ-6,8-ジメトキシ-インフラボン(II)及び5,7-ジヒドロキシ-6,8-トリメトキシ-インフラボン(III)の製造法、特に微生物を培養して、その培養物からこれ等の化合物を採取する方法に関するものである。

本発明者等はカタコールアミン類のカタコール骨格のメチル位の水酸基をメチル化するCOMTの阻害物質を系統的に探索し、放線菌の培養液及び菌体内にその阻害物質の存在をみだし、これを分離精製して、化学構造の研究を行い、これ等がインフラボン骨格を持つ事を見出しさらに化学的・生理学的研究からこれ等以上記(I), (II), (III)の化学構

法を有する新規化合物である事を明らかにすると共に、微生物を培養して、培養物からこれ等の化合物を採取する方法を説明した。

本発明以前には天然物中にも化学合成物中にも化合物(I)、(II)、(III)は報告されていない。實がつて(I)、(II)、(III)の化合物を採取したのは本発明者等が最初である。

本発明以前には0047の阻害剤は外部より注入されたアドレナリン、ノルアドレナリン等の消失速度を遅らせ、アドレナリン、ノルアドレナリンによる血圧上昇作用の延長及び増強作用を有する事が報告され、又この阻害剤には内在のカテコールアミン類の減少によつて起るとされているうつ病などの病気の治療剤となる可能性が考えられる。さらに分枝病の原因は替々いわれているがその一つに生体アミンの異常メチル化合物(カテコールアミン、セロトニンのメチル化合物)が体内で発生することが原因であると云う仮説があり、特に分枝病等における幻覚症状の発現はカテコールアミン類の異常メチル化合物によつて起ると言われている。

の事により化合物(I)、(II)、(III)は高血圧症及び動脈硬化症などの病気の治療剤としての可能性及びパーキンソン症候群のドーパでの治療に際しての阻害剤となり得る可能性などが期待される。さらに化合物(I)、(II)がヒスタジン脱炭酸酵素を阻害する事を発見したがこの事は人の表皮及びアレルギー症の治療剤としての可能性も考えられる。

本発明以前には前記インフラボゲン類(I)、(II)、(III)は天然物のなかには存在する事が知られていなかったが本発明者等は数種の菌類菌株IOP 5174であるアクチノミセス・ロゼオルス(*Actinomyces roseolus*) ; 文献 R.B. Shirling 等, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 18巻, 167頁, 1968年; O.P. Gause, *Zur Klassifizierung der Actinomyceten*, 28頁, 1952年 (Verlag Gustav Fischer Verlag, Jena) を培養して、培養物から前記化合物(I)、(II)、(III)を数多く採取する方法を説明した。2か、本例供を昭和48年2月14日、工業技術院微生物工業技術研究所に保管

(文献: R.E. Bimwich, G.S. Kety, J.R. Smythies, *Amines and Schizophrenia*, 1967年, Pergamon Press, Oxford)。そこでCOMTの阻害剤は分枝病及びその幻覚症状の治療剤としての可能性が考えられる。またインフラボゲン類の抗血液作用が村田、池田等によつて報告され (*Agr. Biol. Chem.*, vol 32, No. 740~746, 1968)、さらにコレステロールの蓄を防ぐ事がモールス、モロー、ムーアリス等(O.W. Moersch, D.W. Morrow, W.A. Newkiss; *J. Med. Chem.*, 10(1), 154~158, 1967)によつて報告されている。また本発明者等はデビズ、アワバ等(Y.E. Davis, J. Awabara; *J. Biol. Chem.*, 233, 124~127, 1960)のドーパ脱炭酸酵素の活性の測定法を用いて化合物(I)、(II)、(III)のこの酵素に対する阻害度を測定し、化合物(I)、(II)が強く本酵素を阻害し、化合物(III)は阻害を示さない事を発見した。又化合物(I)、(II)、(III)を高血圧自然動物ラットに投与した時、その血圧を低下させる事を発見した。これ等

を既申請し、微生物菌種番号は分1006号である。

本発明により、化合物(I)、(II)、(III)はそれを生産する菌株を通常の微生物の培養法として公知の方法で培養して培養物中に生産せしめられる。例えば化合物(I)、(II)、(III)の生産菌アクチノミセス・ロゼオルスは、グリセリン・アムペラゼン培養液、即ち麦芽米天地等の公知の培地に継代培養され、化合物(I)、(II)、(III)の生産のためにこれ等の培地培地上の発育菌糸を直接生産培地に接種して培養できる。また菌株培地に発育せしめた菌体を菌液として生産培地に接種して培養し生産せしめる事ができる。

アクチノミセス・ロゼオルスは25°~35°Cで発育するがこれ等の化合物の生産には25°~30°Cが好ましい。

アクチノミセス・ロゼオルスを培養して化合物(I)、(II)、(III)を生産せしめるためには、カビ、不完全菌、放線菌、細菌などの微生物の培養に公知の培養液はすべて利用できる。例えばグルコース、

マルトース、ラクトース、サツカロース、グリセリン、デキストリン、澱粉、大豆粕、餅炭等を培養液として利用できる。大豆粕 2.0 g、餅炭エキス 0.5 g、 NaOH 0.25 g、 CaCO_3 0.35 g、

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 g、 $\text{MnO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 gを含む培地を基礎培地として、上記の培養液を下記の組成になる様に添加した培地 12.5 ml を 500 ml の坂口フラスコに分注して、180℃で30分間、加熱殺菌し、これにグリセリン・アスベラギン寒天斜面培地に27℃で14日間培養した菌糸を一日金耳接種し、27℃で振盪培養したとき、培地5日目のCOMTの阻害率は下記の様であつた。

培養液の組成と濃度	pH	培養液	COMT阻害率
マルトース 2%	7.2	×2	25%
ラクトース 1%	7.2	○	55%
サツカロース 2%	7.2	○	30%
グリセリン 1%	7.5	○	35%
デキストリン 1%	7.8	○	35%

培養液の組成と濃度	pH	培養液	COMT阻害率
グリセリン 2%	8.0	×2	55%
ラクトース 2%	7.8	○	55%
サツカロース 2%	7.5	○	50%
デキストリン 2%	7.3	○	50%
餅炭エキス 2%	7.0	○	50%

上記の様に何れの培養液もこれらの化合物の生産に利用できるが特にグルコース、澱粉が好適な培養液である。

化合物①、即ち、菌の生産のために放線菌、カビ、不完全菌、細菌その他の微生物の培養のために用いられる培養液はすべて利用できる。例えばペプトン・肉エキス、餅炭エキス、大豆粕、大豆粕、コーンスティープリカー、カザミノ酸、餅炭等が利用できる。上記の様にグルコース 2 g、澱粉 2 g、 NaOH 0.25 g、 CaCO_3 0.35 g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 g、 $\text{MnO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 gを含む培地を、下記の組成になる様に培養液を添加して殺菌し、これに前記の寒天斜面培地に培養せしめた菌糸を接種して5日間振盪培養したとき、COMTの阻害率を表記すると次の如くであつた。

培養液の組成と濃度	pH	培養液	COMT阻害率
大豆粕 2.0%	7.6	×2	58.0%
餅炭 2.0%	7.6	○	45.0%
餅炭エキス 0.5%	7.6	○	51.0%
餅炭/餅炭エキス 0.5%	7.8	○	50.0%
餅炭/餅炭エキス 0.5%	7.6	○	50.0%

培養液の組成と濃度	pH	培養液	COMT阻害率
肉エキス 0.75%	7.8	×2	15.0%
ペプトン 0.5%	7.8	○	55.0%
大豆粕 2.0%	7.5	○	45.0%
大豆粕 (7/27/74)	7.3	○	45.0%
大豆粕 (2/27/74)	7.3	○	45.0%
大豆粕 2.0%	7.3	○	50.0%

化合物①、②、③はCONTの阻害によつて定

次に化合物①、②、③の抽出精製について記述する。これ等の化合物はアルコール性の水、メタノール、エタノール、アセトン等の溶媒に溶け、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等に僅かに溶

上記の操にして得た抽出乾固物は石綿エーテル、ノルマルヘキサン等で処理すると、①、②、③の化合物は共に不溶解に移行する。さらにこの不溶解物をアセトンで抽出すると溶解層に活性部が移行し、残物は不純物として除かれる。このアセトン抽出液を減圧蒸餾乾固し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、ベンゼン：アセトン（20：1）で抽出すると活性の強い三個のフラクションに分離される。さらに各々の活性部の活性物質はセフアダグタスLH-80を用いたカラムクロマトグラフィー、アルミナを用いたカラムクロマトグラフィー、必要を辨じシリカゲルの再タ

ロマトグラフィーによつて精製され、最初の活性フラクションからは化合物(I)、2番目からは化合物(II)、最後のフラクションからは化合物(III)が各々結晶として単離される。

これ等の化合物の遊化学的性質は下記の表1のとくであり、さらに詳細な化学構造の研究の結果、化合物(I)はβ,5,7-トリヒドロキシ-4',8'-ジメトキシ-イソフラボン、化合物(II)はβ,5,7-トリヒドロキシ-4',8'-ジメトキシ-イソフラボン、化合物(III)はβ,7-ジヒドロキシ-β,6,8-トリメトキシ-イソフラボンであると本発明者等は決定した。

表 1

遊 化 学 的 性 質	I	II	III
性 状 (結 晶)	無色針状 (170°)	無 色 針 状 (180°)	無 色 針 状 (180°)
元 素 分 析 例 (g)	C: 61.02, H: 4.51, O: 33.29	C: 61.63, H: 4.50, O: 34.31	C: 62.66, H: 4.79, O: 32.35
マ ス ペ ー ジ ャ ル	550	550	544
分 子 式 (分 子 量) と 融 点	C ₁₇ H ₁₄ O ₆ (330.28) C: 61.02, H: 4.51, O: 33.29	C ₁₇ H ₁₄ O ₆ (330.28) C: 61.63, H: 4.50, O: 34.31	C ₁₈ H ₁₆ O ₆ (344.32) C: 62.66, H: 4.79, O: 32.35
溶 化 剤 と 色 反 応	① 無色	② 無色	③
ボ ン プ ス の 反 応	無 色	黄 色	黄 色
-OCH ₃ の 数 (NMR から)	3	2	3
アセチル基の導入数 (NMR から)	5	5	2
赤 外 吸 収 係 数 (100%) ① エタノール ② エタノール (過酸化アルミ) ③ NaOH 溶液 (エタノール)	1) 290.0cm (log ε: 4.505), 205cm (ε) 2) 165.0cm (log ε: 4.302), — 3) 170.0cm (log ε: 4.507), 160cm (ε)	1) 290.0cm (log ε: 4.318), 205cm (ε) 2) 165.0cm (log ε: 4.500), — 3) 170.0cm (log ε: 4.310)	1) 290.0cm (log ε: 4.314), 205cm (ε) 2) 165.0cm (log ε: 4.518), 205cm (ε) 3) 170.0cm (log ε: 4.310), —
赤 外 吸 収 スペクトル (100%)	5600 1650 1630 1600 1520 1470 1380 1300 1260 1200 1170 1130 1070 1030 1000 970 900 870 820 810 780 730 670	5600 1650 1620 1600 1510 1430 1370 1320 1270 1200 1170 1130 1060 1030 990 940 900 880 830 810 780 720 670	5500 1650 1610 1580 1510 1470 1380 1320 1300 1270 1220 1190 1150 1100 1060 1020 1000 980 930 900 880 800 780 720 710
NMR (DMF-d ₂) 100MHz (ppm)	18.20(OH):s 10.74(OH):m 9.05(OH):m 8.53(H):s 7.05(H):s 6.97(H):s 6.84(H):s 4.78(H):s 4.82(H):s	12.65(OH):s 10.78(OH):m 9.04(OH):m 8.40(H):s 7.06(H):s 6.97(H):s 6.53(H):s 5.79(H):s 5.81(H):s	10.00(OH):m 9.00(OH):m 8.20(H):s 7.07(H):s 6.98(H):s 5.90(H):s 5.85(H):s 5.81(H):s
薄 層 クロマト (シリカゲル) 1) ベンゼン/エタノール (5:1) 2) ベンゼン/エタノール (40:1) 3) ベンゼン/酢酸エチル (1:1)	1) 0.80 2) 0.80 3) 0.65	1) 0.28 2) 0.31 3) 0.60	1) 0.10 2) 0.31 3) 0.60

次に化合物(I)、(II)、(III)の生物学的性状について記述する。化合物(I)、(II)、(III)の毒性は20mg/mlチルスルホキサイド水溶液に溶解して、マウスの腹腔内に投与したとき300mg/kgで毒性を示さなかつた。

前述の測定法でCOMT活性の50%阻害の濃度を求めると化合物(I)は0.5γ/α (1.515×10^{-4} モル)、化合物(II)は5.0γ/α (1.515×10^{-3} モル)、化合物(III)は0.2γ/α (5.80×10^{-4} モル)であつた。なおこれ等の物質は本発明者等が記載した方法でチロシン水酸化酵素(7. Antibiotics, 21, 350, 1968)及びドーパミン水酸化酵素(3. Antibiotics, 21, 354, 1968)の阻害活性を測定したが100γ/αでそれ等の酵素の阻害作用は認められなかつた。さらに初記の方法でドーパミン水酸化酵素の阻害を調べると化合物(I)は12.0γ/α (3.79×10^{-3} モル)、化合物(II)は5.0γ/α (1.515×10^{-3} モル)で50%の阻害率を示したが化合物(III)は100γ/αで阻害を示さなかつた。又前述の制

薬法でヒスタジン脱炭酸酵素の阻害を調べると化合物(I)は6.0γ/α (1.8×10^{-3} モル)、化合物(II)は1.5γ/α (4.5×10^{-4} モル)で50%の阻害率を示したが、化合物(III)は10.0γ/αの濃度で約51.9%の弱い阻害率を示した。上記のような化合物(II)は他の酵素の阻害活性を示さずCOMTのみに阻害活性を示す極めて特異的な化合物である。

化合物(I)、(II)、(III)は100γ/αで細菌類、カビ類に対して発育阻止作用を示さなかつた。

又化合物(I)、(II)、(III)を実験用自然発症ラットの腹腔内に投与し、その血圧降下作用を調べた結果の1例を示すと化合物(I)では50mg/kgの投与で1時間後20.0%、5時間後18.4%、6時間後38.0%、24時間後5.8%、12.5mg/kgの投与で1時間後13.8%、5時間後10.9%、6時間後18.8%、24時間後7.8%の血圧降下作用を示した。化合物(II)は50mg/kgの投与で1時間後22.3%、5時間後30.9%、6時間後35.3%、24時間後23.9%、4.8時間後

16.3%、12.5mg/kgの投与で1時間後18.4%、5時間後34.4%、6時間後32.8%、24時間後18.0%、4.8時間後18.0%、5.2mg/kgの投与で1時間後21.0%、3時間後26.3%、6時間後29.0%、24時間後22.0%、4.8時間後13.4%の血圧降下作用を示した。化合物(III)では50mg/kgの投与で1時間後13.9%、5時間後13.0%、6時間後17.3%、24時間後7.0%、4.8時間後、2.8%の弱い血圧降下作用を示した。

以下、本発明によるインフラマン類の新規化合物(I)、(II)、(III)の製造法の実施例を示すが、本発明により化合物(I)、(II)、(III)が微生物で造られる事が明らかにされたのでこの明細書に記載された知見に基づいて、本明細書に記載された方法を修飾した方法が容易に設定される。本発明者等が微生物が造る酵素阻害物質の系統的研究で示した様に、酵素阻害物質の生産は特定の菌種に限らない。かくして本発明で放線菌の一種による化合物(I)、(II)、(III)の生産が明らかにされたので放線菌の他の菌種を

用いて生産せしめる事は専門家にとつて容易な事である。

本発明はそのすべての修飾方法をも包括し、実施例はその例示で、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例 2

化合物(I)、(II)、(III)を生産する放線菌アグチノミセス・ロゼオリスをグリセリン・アセバザン寒天斜至培地に24日培養させ、その菌液から一白金耳量、大豆粕2%、グルコース1%、酵母粉2%、 NaCl 0.25%、 CaCO_3 0.55%、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $2\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%を含む培地を殺菌前pH7.4に修正して、125℃、20.0分間の滅菌後、500ccの坂口コルペンに分注し、120℃、20.0分間殺菌した培地に接種し、27℃で毎分130往復の振盪で8日培養した。pHは培養前7.0、2日後6.8、3日後6.4、4日後6.8、5日後7.2であつた。培養中の残糖はベルトラン法で還元糖を分析すると、2日後で

2.85g、3日後で1.00g、4日後で0.85g、5日後で0.25gであつた。この培養液5000ccを伊通して伊数4000ccを得た。この伊数の00MT阻害活性は3倍に希釈して44%の阻害率を示した。この4000ccの伊液を2N-HClでpH 2.0に修正し4000ccの酢酸ブチルで抽出し(収率80%)、抽出液を外温60℃で減圧濃縮乾燥すると18.5gの赤褐色のシラップ状物質が得られ、さらに石油エーテル2000ccで処理すると9.5gの石油エーテル不溶部が得られ、この00MTの阻害活性は250%で80%の阻害率を示し、石油エーテル可溶部はほとんど阻害率を示さなかつた。得られた石油エーテル不溶部をアセトン100ccに溶解させて不溶部を除き、50%のマリンダロフト社製のシリカゲル(AR-100~200メッシュ)をアセトン溶液中に加えて減圧濃縮乾燥させ、ベンゼン:アセトン(10:1)の溶媒系でシリカゲル(前記マリンダロフト社製)500gをゲル化させる×90cmのカラムに充填したカラムを用いて、

ヤーファーマンター(4分)の培養液4.5mlをバスケット型の遠心分離機で毎分2600回転で遠心分離を行い、伊数40ml、懸体固形部8%が得られ、懸体固形部は5%のメタノールで抽出するとメタノール溶液4.8mlが得られた(伊数は1%で60%、メタノール抽出液は1%で80%の00MTの阻害率)。メタノール抽出液を500ccまで減圧濃縮し、伊液と合せて2N-HClでpH 2.0とし実施例1と同様の比率で酢酸ブチル抽出を行い、抽出液を減圧濃縮乾燥すると80.0gの油状物質が得られ、さらに石油エーテル4.0%で処理すると石油エーテル不溶部は88.0gの褐色の粉末が得られ、この粉末の活性は全体の88%であつた。この粉末を実施例1で示した方法の3倍の比率で、実施例1と同様にカラムクロマトグラフィーを行い最初の活性部からは790mgの黄色粉末、2番目からは280mgの黄色粉末、3番目からは180mgの褐色の粉末が得られた。これらの粉末の00MTの80%阻害量は各々20%, 80%, 20%であつた。

その上端に乾燥物を施置させ、前記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行うと活性部が3個のフラクションに収めて抽出され、最初のフラクション750ccを濃縮乾燥すると淡黄色の粉末88.0mgが、2番目のフラクション2000ccからは黄色の粉末84.0mgが、最後のフラクション1500ccからは18.8mgの褐色の粉末が得られた。これらの粉末の阻害阻害活性は各々80%, 90%, 5%で80%の阻害率を示した。

実施例 2

実施例1と同様な方法で培養を調整し、同様の方法で培養培養を行い、培養5日目の培養液500ccを、実施例1と同組成の培養液を50%容のジャーファーマンターに3%充填込み、120℃、50分間高熱蒸気中で殺菌し、シリコン樹脂を約1.5%添加して消泡し、ジャーファーマンター2番目につき接種する。24℃で300時間、培養空気を毎分1.2%通気し、毎分250回転の攪拌機で攪拌しながら、発泡した時はシリコン樹脂を加えながら培養を観けた。この様にして得たジ

さらに最初の活性部をメタノール100ccに溶解させセファグクスマLB-20(500cc)のカラムクロマトグラフィー、メタノール抽出法で活性部は3つのピークと成り1800ccにまで分けて抽出された。この活性フラクションを減圧濃縮乾燥後、アセトン5ccに溶解させた後ノルマルヘキサン50ccを加えて一夜室温に放置すると化合物1の淡黄色針状結晶が18.8mg得られ、さらに再結晶化で18.0mgの純粋な化合物(1)が得られた。2番目の活性部も同様にセファグクスマLB-20のクロマトグラフィーで不純物を除き、さらに4ccのベンゼンを加えて60℃に加熱して溶解させ一夜室温に放置すると30mgの黄色の粗結晶が得られ、同様な方法で再結晶化を行い18.8mgの化合物(2)の淡黄色針状結晶が得られた。

3番目の活性部は重量の3倍量のアルミナ(グエール社・中性化アルミナ)をメタノールでカラムに充填し、メタノールで溶解させた活性部を通過させると色素だけがアルミナに吸着され褐色と成る。この通過液をセファグクスマLB-20

のクロマトグラフィーを行い1番目の活性成分と同様に処理すると11.3分の化合物の無色針状結晶が得られた。

実施例 8

メタによる培養は実施例1と同様にして培養した種母を第1次種母とし、実施例8と同様にして培養した種母を第2次種母として、200ml容のステンレス・スティール製のメタ槽に、実施例1、2と同様な培地を200mlを仕込み120℃で50分間、高熱滅菌で殺菌し、シリコン樹脂を0.01%添加後、第2次種母を5%接種し、毎分120mlの殺菌空気を送り、毎分200回転で攪拌し、37℃で96時間培養した。

この培養液(メタ槽25分)200mlをフィルター、プレスで処理し、母液200ml、固形固形部40gを得た。固形固形部は80mlのメタノールで抽出し、メタノール抽出液70mlを得た。母液は3倍に希釈して80%の飽和率を示し、メタノール抽出液は8倍に希釈して80%の飽和率を示した。これらの母液及びメタノール抽出液は興

隆例2と同様の比率で同様に抽出精製、結晶化を行い化合物(1)の結晶335号、化合物(2)の結晶180号、化合物(3)の結晶78号を得た。

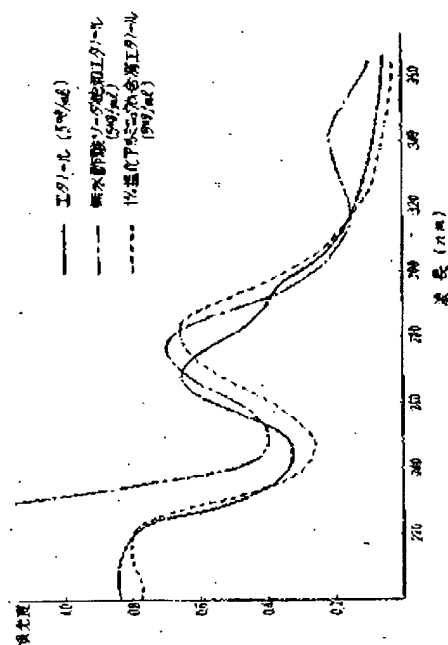
4. 図面の簡単な説明

第1図、第2図、第3図は化合物(1)、(2)、(3)のIR/IRの純エタノール溶液、無水酢酸ソーダ相エタノール溶液、2%過化アルミニウム含有エタノール溶液中での紫外吸収スペクトルを示す。

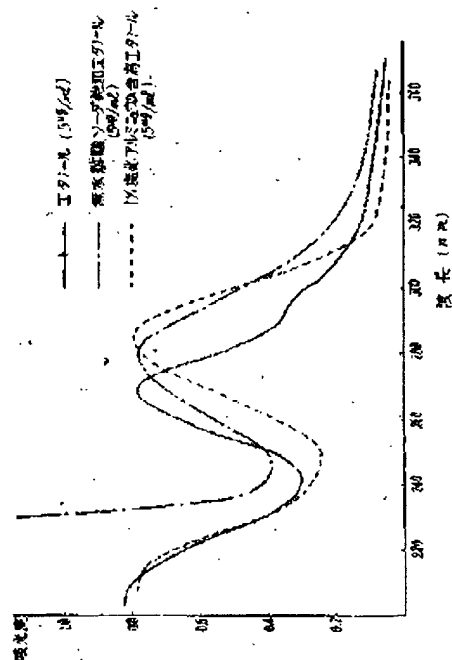
第4図、第5図、第6図は化合物(1)、(2)、(3)を具化カリウムとして測定した紫外吸収スペクトルを示す。

代理人	金	丸	廣	男
同	順	内	忠	夫
同	八	木	田	茂
同	浜	野	孝	雄
同	兼	田	哲	二

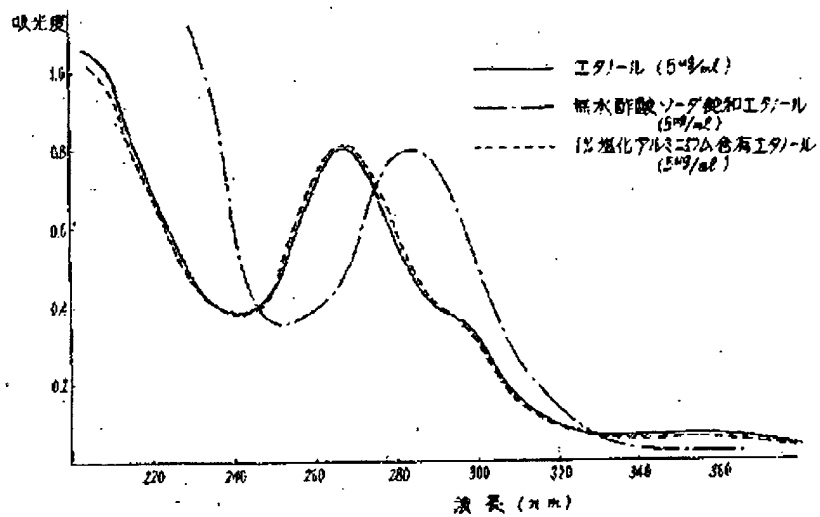
第1図



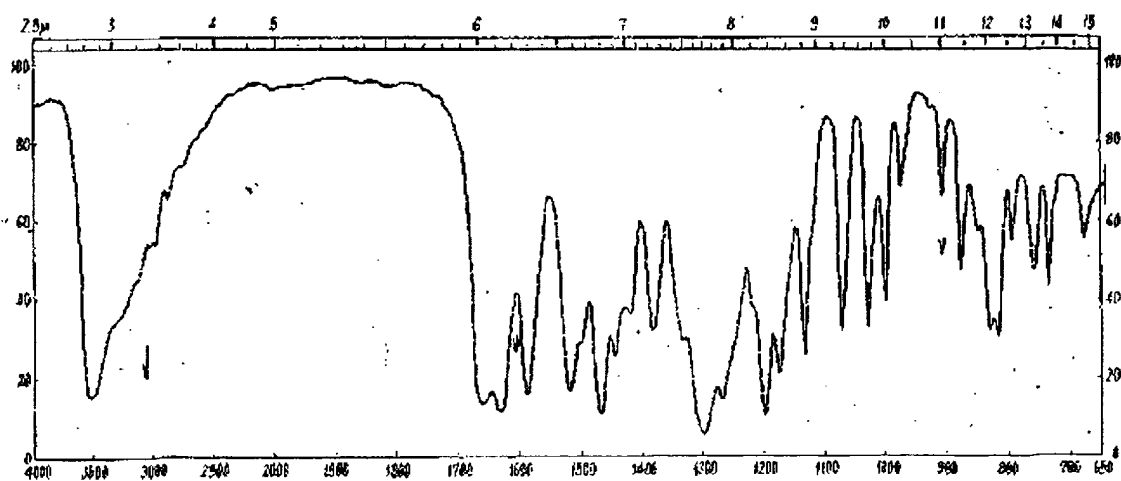
第2図



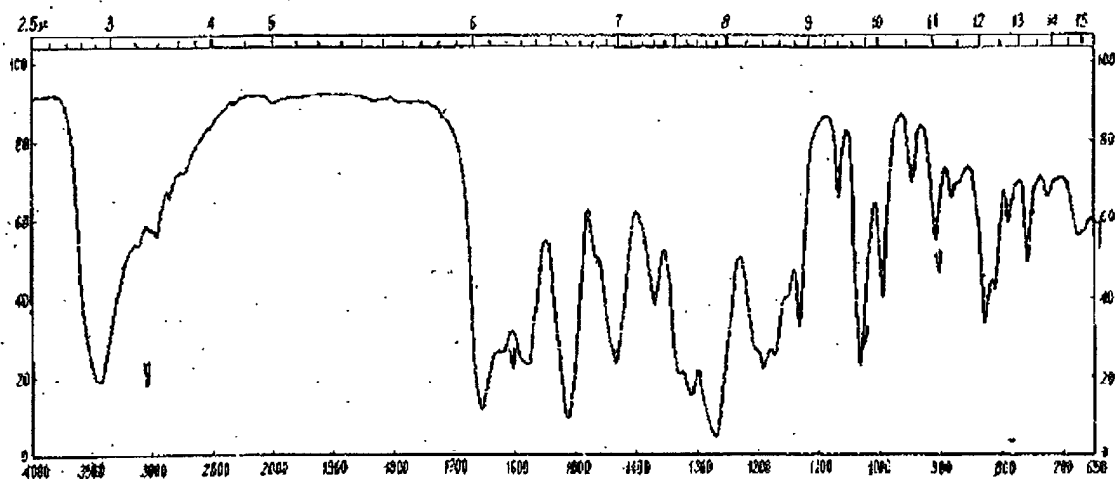
第3図



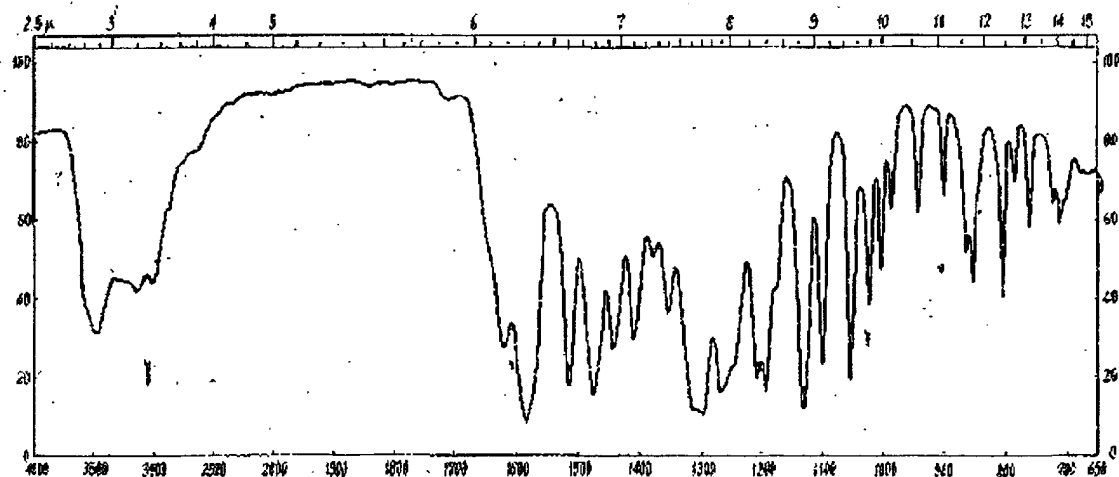
第4図



第5図



第6図



5. 添附書類の目録

- (1) 明細書 1通
(2) 図面 1通
(3) 委任状 1通
(4) 微生物受託番号通知書 1通

6. 前記以外の発明者、代理人

(1) 発明者

住所 東京都品川区東五反田5丁目1番11号
ニム・フジマンション701-A

氏名 竹内 富雄

住所 東京都北区志茂3の17の1

氏名 幸村 義夫

住所 神奈川県高尾郡檜町吉岡1626-51

氏名 渡 方

住所 東京都保谷南富士町1丁目7番3号の4

氏名 渡 田 雄

(2) 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号
三井物産館内

氏名 朝内 忠夫

住所 八木田 茂

住所 浜野 孝雄

住所 森田 哲二

特許 50-35393 (11)

23(11)

手続補正書 (自発)

昭和 48 年 11 月 12 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和 48 年 特 許 願 第 83884 号

2. 発明の名称

カテコールオーメタル転写膜の阻害作用を有する
新規インフラボン化合物の微生物による製造法

3. 補正をする者

事件との関係 発明者本人

住所 東京都品川区上大崎3丁目2番23号

特許代理人 財団法人微生物化学研究会

4. 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号、三井物産館内

(2400) 氏名 金丸 義 興

補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

補正の内容

(1) 明細書第4頁第2行「コレステロールの増
を」を「コレステロールの沈着を」と修正す
る。

(2) 同 第4頁第1行「微生物受託番号は第
1906号」を「微生物受託番号は微工研菌番
第1906号」と補正する。

(3) 同 第4頁第2行「 NaCl 」を「 NaCl 」と
補正する。

(4) 同 第12頁第1行「COMT」を「COMT」
と補正する。

(5) 同 第14頁第1中化合物Iの欄の表か
ら7列目「紫外線吸収」の欄の

「1) 267.0 nm (ϵ_{max} : 4.303), 295 nm
(3)

2) 287.0 nm (ϵ_{max} : 4.301), -

3) 298.0 nm (ϵ_{max} : 4.309), 340 nm
(3)」を

「1) 267.0 nm (ϵ_{max} : 4.303), 295 nm(3)

- 2) 289.0 nm ($\log \epsilon: 4.301$)
 3) 272.0 nm ($\log \epsilon: 4.307$) 390 nm (4)

と修正し、次の

「紫外吸収スペクトル」の列の第1行目・番目の「1383」を「1380」と修正し、次の「NMA (DMSO-d₆)」の列の下から2行目「OCH₃」を「OCH₃」と修正する。更に

表1中化合物3の欄の上から7列目「紫外吸収」の列の3)の行の右端の「-」を削除し、次の「紫外吸収スペクトル」の列の最下空行の「242」の次に「259」を加える。

- (6) 同 第17頁第9行「 $0.97/00$ ($1.515 \times$)」を「 $0.97/00$ ($1.11 \times$)」と修正し
 (7) 同 同 第8~9行「 $3.07/00$ (1.515×10^{-2} セル)」を「 $2.07/00$ (1.00×10^{-2} セル)」と修正する。
 (8) 同 第18頁第6行「上記のよう様」を「上記のよう様」と修正する。

- (9) 同 同 下から第4行「7.2%」を「7.7%」と修正する。

- (10) 同 第20頁第3行「である。」を「である。」と修正する。

- (11) 同 第24頁第4行「1800」を「1800」と修正する。